



证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2001 09 21

申 请 号： 01 1 28486.2

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 转乙型肝炎表面抗原（H B s A g）基因盐藻的制备方法

申 请 人： 薛乐勋

发明人或设计人：薛乐勋；潘卫东；姜国忠；陈占宽；严海燕；王建民；吕玉民；张贵星；谢华；郭玉忠；牛向丽；侯桂琴；李杰；王建人；杜保华



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2002 年 3 月 5 日

权 利 要 求 书

1、一种转乙型肝炎表面抗原(HBsAg)基因盐藻的制备方法,其特征在于:编码重组 HBsAg 蛋白的 DNA 序列和含有特定的筛选标记基因,利用转基因技术,将它们导入盐藻,通过继代选择培养,建立转 HBsAg 基因盐藻藻株,供制备乙型肝炎口服疫苗使用。

2、根据权利要求 1 所述的转乙型肝炎表面抗原(HBsAg)基因盐藻的制备方法,其特征在于:编码重组 HBsAg 蛋白基因的 CtxB-SS1 融合基因的构建和盐藻表达载体 pCAMBIA-CtxB-SS1 的构建。

3、根据权利要求 2 所述的转乙型肝炎表面抗原(HBsAg)基因盐藻的制备方法,其特征在于:重组乙型肝炎表面抗原(HBsAg)蛋白基因包括乙型肝炎病毒 S 基因、PreS1 基因和 PreS2 基因的全部或部分序列及其组合。SS1 基因是指 S 基因和 PreS1 基因部分序列的融合;CtxB-SS1 融合基因是指霍乱毒素 B 亚单位基因(CtxB)和 SS1 基因的融合。

4、根据权利要求 2 所述的转乙型肝炎表面抗原(HBsAg)基因盐藻的制备方法,其特征在于:将 CtxB-SS1 融合基因序列插入到盐藻 Hsp70B5'启动子和 T-Nos 终止子之间,构成完整的表达盒,使 CtxB-SS1 融合基因在盐藻 Hsp70B5'启动子控制下转录。

5、根据权利要求 2 所述的转乙型肝炎表面抗原(HBsAg)基因盐藻的制备方法,其特征在于:表达载体中含有两个同向的核基质结合序列(Matrix attachment region, MAR) MAR1 和 MAR2,在 MAR1 和 MAR2 间插入能表达硝酸盐还原酶的 Nit15'-Nit1-T-Nos 表达盒,供筛选转化藻用。

说明书

转乙型肝炎表面抗原(HBsAg)基因盐藻的制备方法

(一) 发明领域:

本发明涉及采用基因工程技术, 制备转乙型肝炎表面抗原(HBsAg)基因盐藻的方法。

(二) 发明背景

乙型肝炎病毒感染是一种严重危害人类健康的传染病, 慢性乙型肝炎容易发展为肝硬化和肝癌。乙型肝炎感染率很高, 据估计全世界约有 3.5 亿人为乙型肝炎病毒慢性携带者。我国是乙型肝炎的高感染区, 乙型肝炎病毒感染率为 57.68%, 乙型肝炎病毒慢性携带率为 9.75%。控制乙型肝炎传染的主要手段是接种疫苗。目前临床上使用的疫苗主要由啤酒酵母表达的乙型肝炎表面抗原主蛋白颗粒组成, 效果良好, 对控制乙型肝炎传播起到了巨大作用。但这种疫苗有一些不足之处。部分人群对疫苗存在不反应或低反应性, 疫苗接种后可能产生逃逸突变。且疫苗价格高, 难于在贫穷的发展中国家普遍推广。因此开发效果好、使用方便而且价廉的疫苗, 对于全球范围内控制乙型肝炎病毒传播具有重要意义。

众所周知, 植物作为生产药用蛋白的生物反应器, 为人类提供了一个更加安全和廉价的生产系统。与微生物发酵和转基因动物等生产系统比较, 它具有许多优点: 1、一些微生物系统不能对真核生物蛋白进行准确的翻译后加工和蛋白糖基化; 大肠杆菌发酵过程常常产生一些不溶性聚合物, 而将这些聚合物重新溶解并折叠成天然蛋白质, 难度极大; 此外发酵常需要庞大的设备投资。2、动物细胞培育所需费用昂贵, 用转基因动物生产重组蛋白, 可能会污染动物病毒, 这对人类可能造成潜在威胁。植物病毒不会感染人类, 故用转基因植物生产重组蛋白更为安全。3、植物细胞培养不需要昂贵培养基和复杂的纯化系统, 也不需要严格无菌的生产条件和冷藏保存。

盐藻(*Dunaliella salina*), 属绿藻门团藻目多鞭毛藻科。为单细胞真核生物, 个体呈梨形或椭圆形, 细胞体积 $50-1000 \mu\text{m}^3$ 。具有 2 条长鞭毛, 可自由游动。盐藻细胞与其它一些单细胞真核藻类最大的不同点是它缺乏细胞壁,

细胞外仅包被一薄层弹性浆膜。藻体内有一杯状叶绿体，内含一个造粉核。藻体前端有一红色眼点。其繁殖主要靠细胞纵裂的无性繁殖，有性生殖为同配接合。盐藻是目前所知耐盐性最强的单细胞真核生物，生长在海水或咸水湖等高盐环境下。由于无细胞壁，可通过快速的细胞体积变化来适应细胞外渗透压的变化，因此对环境适应性极强，可在低浓度（0.2%）和接近饱和的高浓度（35%）盐水中生长。盐藻具有很强的光合作用能力，能利用水和空气中的二氧化碳在阳光照射下合成蛋白质等多种有机物，因此盐藻的养殖容易，成本低廉。

（三）发明内容：

本发明的目的正是针对上述现有技术中所存在的问题而旨在研制一种转乙型肝炎表面抗原（HBsAg）基因盐藻的制备方法。将重组人 HBsAg 基因，通过目前国际上公认较为成熟的遗传转化技术（电激法，基因枪法等）导入盐藻细胞中，使其表达，建立盐藻生物反应器，用来制备或生产口服型乙型肝炎疫苗。

本发明的目的是通过以下方式来实现的：

本发明的转 HBsAg 基因盐藻的制备方法，是将编码重组 HBsAg 蛋白的 DNA 序列和含有特定的筛选标记基因，利用转基因技术，将它们导入盐藻，通过继代选择培养，建立转 HBsAg 基因盐藻藻株，供制备乙型肝炎口服疫苗使用。

该方法包括编码重组 HBsAg 蛋白基因的 CtxB-SS1 融合基因的构建和盐藻表达载体构建。重组乙型肝炎表面抗原（HBsAg）蛋白基因包括乙型肝炎病毒 S 基因、PreS1 基因和 PreS2 基因的全部或部分序列及其组合。SS1 基因是指 S 基因和 PreS1 基因部分序列的融合；CtxB-SS1 融合基因是指霍乱毒素 B 亚单位基因（CtxB）和 SS1 基因的融合。该 CtxB-SS1 融合基因的构建是将 CtxB-SS1 融合基因序列插入到盐藻 Hsp70B5' 启动子和 T-Nos 终止子之间，构成完整的表达盒，使 CtxB-SS1 融合基因在 Hsp70B5' 启动子控制下转录。

高效转化与稳定表达的依据：（1）. 盐藻核基质结合序列 [Chromatin matrix (Scaffold) attachment region (MAR or SAR)] 指导下的同源交换重组。MAR 是染色体中的中、高度重复序列，并且处于转录活跃区。将目的基因插入 MAR 序列之中，可以提高基因转化的效率；MAR 序列位于转录活跃区，整合于该位点的目的基因可以稳定、高效表达。（2）. 诱导型高效启动子：热激蛋白启动子为诱导型启动子，可以提高目的基因的表达效率，可以经济、有效的获得表达产物。（3）. 高效终止子：胭脂碱合成酶基因终止子（T-Nos）。

表达载体构建中含有两个同向的核基质结合序列（Matrix attachment

region, MAR) MAR1 和 MAR2, 而在 MAR1 和 MAR2 间插入 Nit15' — Nit1 — T-Nos 表达盒, 能表达盐藻硝酸盐还原酶, 供筛选转化藻用。

硝酸还原酶基因作为选择标记理由是, 硝酸盐是真核绿藻杜氏盐藻培养中最常使用的氮源。Milk 和 Grant 等人认为 NaNO_3 对于盐藻是最好的氮源。因此, 以硝酸还原酶基因作为转基因硝酸盐还原缺陷型盐藻的基因选择标记是最理想的。在硝酸盐作为唯一氮源的情况下, 硝酸盐既是其必需的营养元素, 又是其选择剂, 具有双重作用。同时以硝酸盐作为唯一 N 源和选择剂, 还解决了以抗生素、除草剂作为选择剂成本高及环境(土壤、水质、作物等)污染等问题。

该盐藻表达载体, 同时加入了除草剂(PPT)抗性基因—Bar 基因作为辅助或第二选择标记, 保证工程盐藻的纯度和质量。工程盐藻在开放环境中生产, 自然界中的杂藻污染, 以及自然环境(土壤、水体等)亚硝酸盐的污染, 可能会使培养的工程盐藻纯度降低。为保证工程盐藻的纯度, 在生产中可建立工程盐藻“种子培养池”。培养工程盐藻时, 可加入硝酸盐和 PPT 双重选择剂。这种“种子”培养池规模很小, 可控制, 培养液可反复处理使用。从而保证工程盐藻的纯度, 又可避免污染环境。

此外, 该载体加入蓝、白斑选择标记 LacZ 基因及多克隆位点 MCS, 可使目的基因在载体中的克隆、选择和鉴定更为容易、方便。该载体以 NPT II (Kan^r) 作为在 *E.coli* 中的选择标记; pUC18 中的 ColE1 复制子, 使其作为高拷贝质粒, 便于基因操作和使用。

在本发明中, 通过转基因技术中的遗传转化生物学方法, 将重组 HBsAg 外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达, 以获得转基因盐藻藻株。常用物理和化学方法包括聚乙二醇(PEG)处理法、电激法和基因枪法等。

本发明以转基因盐藻生产人口服型乙型肝炎疫苗, 与现有的转基因可食性植物如马铃薯、莴苣等比较, 具有以下优点: 1、盐藻为单细胞真核生物, 无细胞壁, 易于遗传操作, 基因工程下游产品工艺简便。2、单细胞盐藻生长快, 无季节性限制。3、培养条件简单, 生产成本低, 易于工业化生产。4、盐藻细胞本身无毒性, 而且富含多种对人体有益的维生素、多不饱和脂肪酸等营养成分。

本发明主要包括四方面技术: 1、盐藻培养技术。2、盐藻表达载体构建, 3、将外源基因导入盐藻的技术。4、转基因盐藻转化子的筛选。

(四)附图说明:

图 1: 重组 HBsAg 盐藻表达质粒 pCAMBIA-CtxB-SS1 的构建

图 2: 盐藻表达载体 pCAMBIA-DS1664

图 3: 重组 HbsAg 盐藻表达质粒 pCAMBIA-CtxB-SS1

(五)具体实施方式:

本发明结合以下实施例做进一步描述,但并不限制本发明。

实施例

一、盐藻培养技术

1、液体培养: 藻种接种于 Mclachlan 培养液, 培养条件如下: 温度 25 ± 2 °C, 光照强度 3000 lux, 每天光照培养 14 小时, 黑暗培养 10 小时。

2、固体培养: Mclachlan 培养液中加入琼脂浓度为 0.5-0.8%, 于超净台用消毒白金耳从液体培养液取藻种立即接种到固体培养基面上, 置恒温箱内培养, 恒温箱中需配置荧光灯照射, 按液体培养条件要求进行培养。

二、HBsAg 盐藻表达质粒 pCAMBIA-CtxB-SS1 的构建

1. 重组乙肝表面抗原 SS1 融合基因的构建

质粒 pBS-SK-HBS 上克隆有乙肝病毒 S 基因、Pre-S2 基因和 Pre-S1 基因序列, 设计四条引物:

引物 1: 5'-GCAGTCGACCCAATG GAGAGCAC-3';

Sal I

引物 2: 5'-GCGGGTACCAGG AATGTATACCC-3';

Kpn I

引物 3: 5'-CTGGGTACCCCA AATCCTCTGGG-3';

Kpn I

引物 4: 5'-GCGGCATGCTTA GTTGGGGTTG-3';

Sph I

分别以引物 1 和 2 扩增 SHBsAg (1-226aa), 以引物 3 和 4 扩增 PreS1 Ag (20-48aa) DNA 片段, 经酶切、回收后连接到质粒 pUC18 的 Sal I/Sph I 位点, 构建成编码重组乙肝表面抗原 SS1 [包括 SHBsAg (1-226aa) 和 PreS1 Ag (20-48aa)] 的融合基因片段, 质粒命名为 pUC18-SS1。

2. CtxB-SS1 融合基因的构建

(1) 根据文献报道的霍乱毒素 B 亚单位基因 (CtxB) 序列, 设计两条引物:

正向引物: 5'-GCGGGATCCATG ATTAATTAAAATTTGG-3'

BamH I

反向引物: 5'-GCGGTCGACAGG ATTTGCCATACTAATTGC-3'

Sal I

以古典霍乱小川型疫苗菌 CVC 0139 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 CtxB 基因序列约 380bp, 经 BamH I/Sal I 酶切后克隆到质粒 pUC18 上, 构建成质粒 pUC18-CtxB。

(2) 以 Sal I/Sph I 双酶切割质粒 pUC18-SS1, 切下 SS1 融合基因片段约 770bp, 连接入质粒 pUC18-CtxB 的 Sal I/Sph I 位点, 构成含 CtxB 基因和 SS1 基因片断的融合基因质粒 pUC18-CtxB-SS1。

3. Hsp70B5'-CtxB-SS1-T-Nos 表达盒的构建

质粒 pSP72-Hsp-Nos 中克隆有盐藻 (*D. Salina* UTEX1664) 热休克蛋白 Hsp70B5'启动子和 T-Nos 终止子。用 BamH I/Sph I 双酶切割质粒 pSP72-Hsp-Nos 和 pUC18-CtxB-SS1, 将 CtxB-SS1 融合基因序列连接到 Hsp70B5'启动子和 T-Nos 终止子之间, 构成完整的表达盒, 使 CtxB-SS1 融合基因在 Hsp70B5'启动子控制下转录。

4. 盐藻表达质粒 pCAMBIA-CtxB-SS1 的构建

盐藻表达载体 pCAMBIA-DS1664 中含有两个同向的核基质结合系列 (MAR1 和 MAR2, 在 MAR1 与 MAR2 序列间顺序连接有 Nit5'-Nit1-T-Nos 表达盒 (可表达盐藻硝酸盐还原酶, 用于转化藻的筛选)、多克隆位点 MCS (来源于 pUC18) 和 Nit5'-BAR-T-Nos 表达盒 (可表达 PPT 抗性, 用于转化藻的辅助筛选), 将构建完整的 Hsp70B5'-CtxB-SS1-T-Nos 表达盒用 EcoR I/Xho I 切下后, 连入载体 pCAMBIA-DS1664 的 EcoR I/Sal I 位点, 构建成表达质粒 pCAMBIA-CTP-SS1, 该质粒可由 MAR1 和 MAR2 序列介导同源重组, 使 Nit1 表达盒和 CtxB-SS1 表达盒及 BAR 表达盒整合于盐藻染色体活跃转录区, 经 PPT 抗性筛选和硝酸盐选择培养筛选鉴定转化藻, 转化藻可经由温度诱导高效表达 CtxB 和 SS1 的融合蛋白。

三、将外源目的基因导入盐藻

1. 用电激法将外源目的基因导入盐藻

取培养第 5 天的盐藻培养液, 1000rpm 离心 15min, 弃上清, 用含有 0.2M 甘露醇和 0.2M 山梨醇液处理后加入电激缓冲液, 调整盐藻密度在 10^8 个/ mm^3 。继

之加入终浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ 的含外源基因的质粒及 $25 \mu\text{g/ml}$ 的鲑精 DNA，混匀后，置冰上 5-10min，吸取 0.5ml 置于轰击小室中待用。电激仪 (Backon 2000 型) 电激时电压为 9.5KV，每次电激时间为 $0.05 \mu\text{s}$ ，次数为 2^{10} ，循环次数 100 次，电激高度 2mm，每次电激间隔时间为 62.5sec。

2. 用基因枪法将外源目的基因导入盐藻

取培养第 5 天的盐藻培养液，1000rpm 离心 15min，弃上清，用盐藻培养液将盐藻密度调整在 10^8 个/ mm^3 ，再取 0.5ml 盐藻培养液铺于含抗生素的固体培养基中央，直径为 3cm 的圆形有效轰击范围内，置超净台下吹干待用。

在无菌条件下，用基因枪 (Bio-Rad 公司产的 PDS-1000 型) 轰击。具体步骤如下：取 $50 \mu\text{l}$ ($60 \mu\text{g/ml}$) 金粉悬浮液加入 $6 \mu\text{g}$ 含有外源基因的质粒以及 $50 \mu\text{l}$ 2.5M CaCl_2 和 $20 \mu\text{l}$ 0.1M 亚精胺，振荡 3min，12000rpm 离心 10 sec，弃上清。用无水乙醇洗一次，振荡，12000rpm 离心，弃上清，共二次。最后将附有金粉的质粒悬浮于 $60 \mu\text{l}$ 无水乙醇中。每次轰击取 $6-8 \mu\text{l}$ ，每皿轰击 3 次，轰击后将培养皿放入盐藻适宜培养条件下培养。

3. 用 PEG 法将外源目的基因导入盐藻

取 0.5ml 盐藻培养液 (细胞密度 10^7-10^8 个 /ml)，在超净台内接种于含抗生素的固体培养基上，直径为 3cm，吹干待用。

构建携带外源目的基因的农杆菌 Ti 质粒和盐藻细胞原生质体。尔后将新制备的原生质体悬浮液与 Ti 质粒 DNA 一起保温培养，同时加入分子量 4000-6000 的 PEG，在 pH8-9 下促进原生质体摄取 DNA，从而使细胞转化，为促进转化，在转化培养时加入运载 DNA (小牛胸腺 DNA)，培养后离心收集原生质体，并重新悬浮到原生质体培养基中继续培养。

四、转基因盐藻转化子的筛选

取电激法或基因枪法转化的盐藻细胞团，用 1ml 培养液 A (5mM NH_4Cl 、 5mM NaNO_2) 洗下，300 lux 弱光培养 2-3 天，转入含 $3 \mu\text{g/ml}$ PPt 的培养液 A 中继续培养 5-7 天，光照周期为 12 小时/天，光强为 1600 lux；之后转入培养液 B (10mM NaNO_3) 中继续光照培养 7-10 天。继之涂布于培养液 B 平板上 (1.0% 琼脂) 光照培养 10-15 天至转化藻落出现。

010028

说明书附图

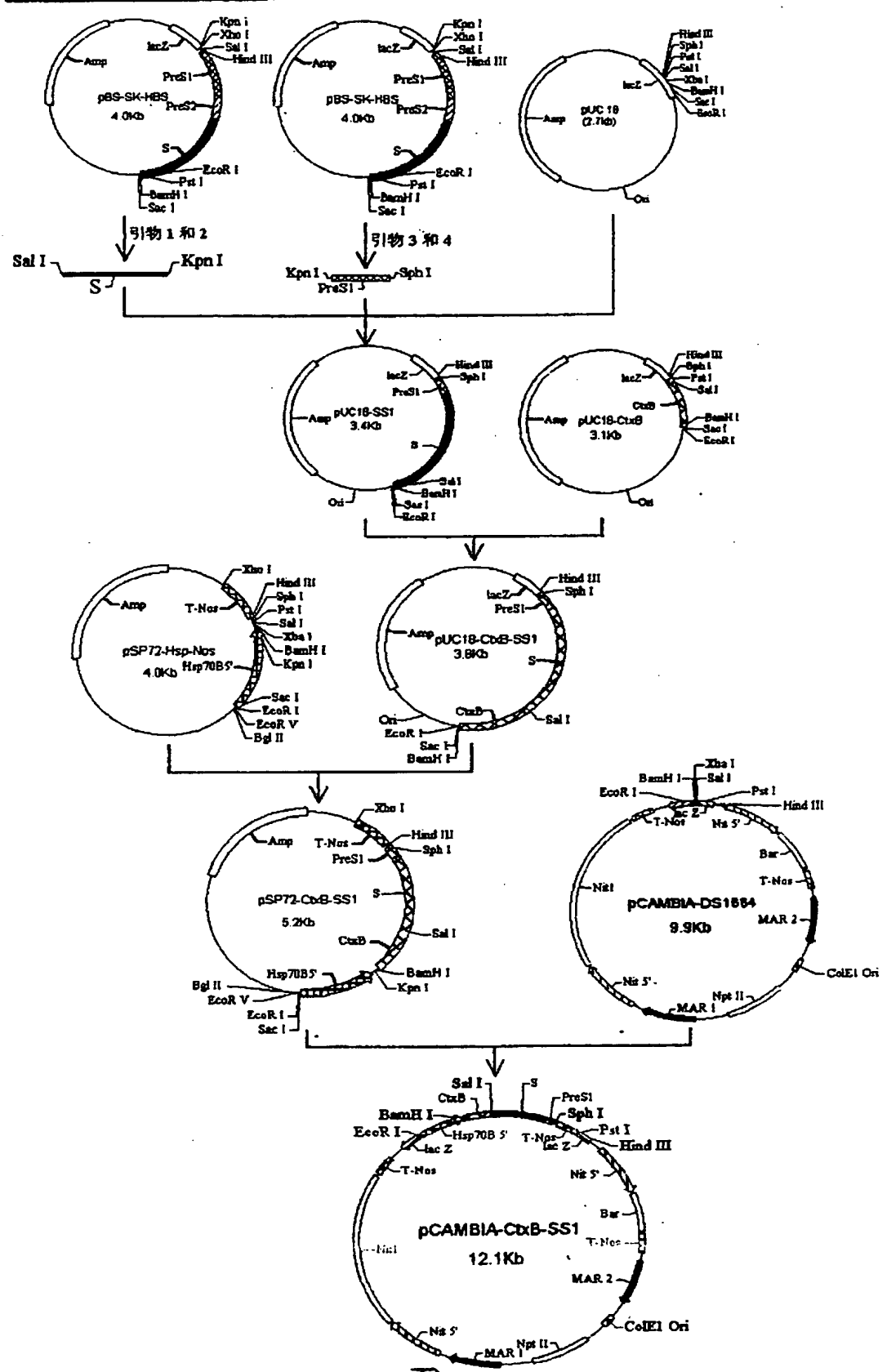


图 1
1

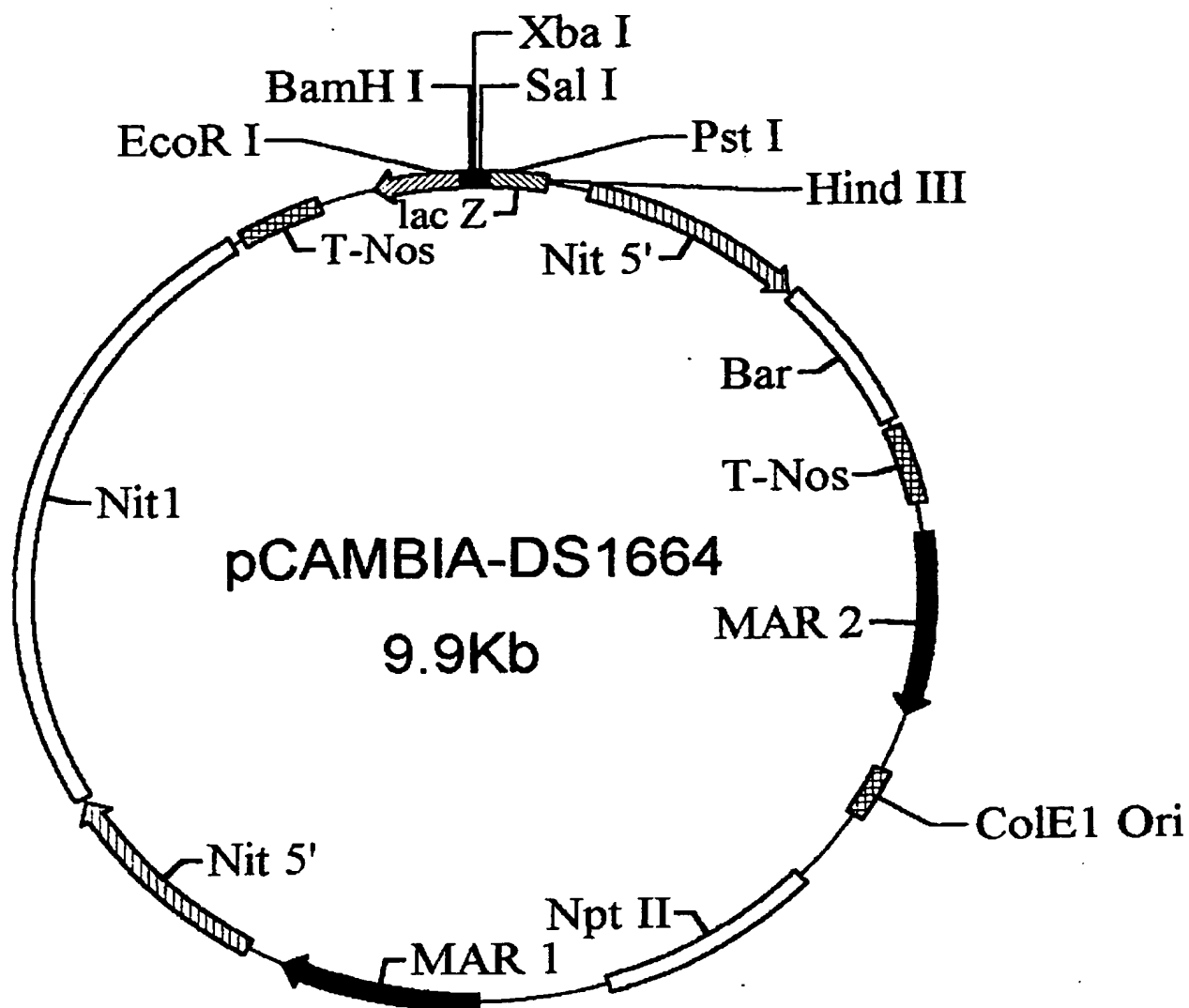


图 2

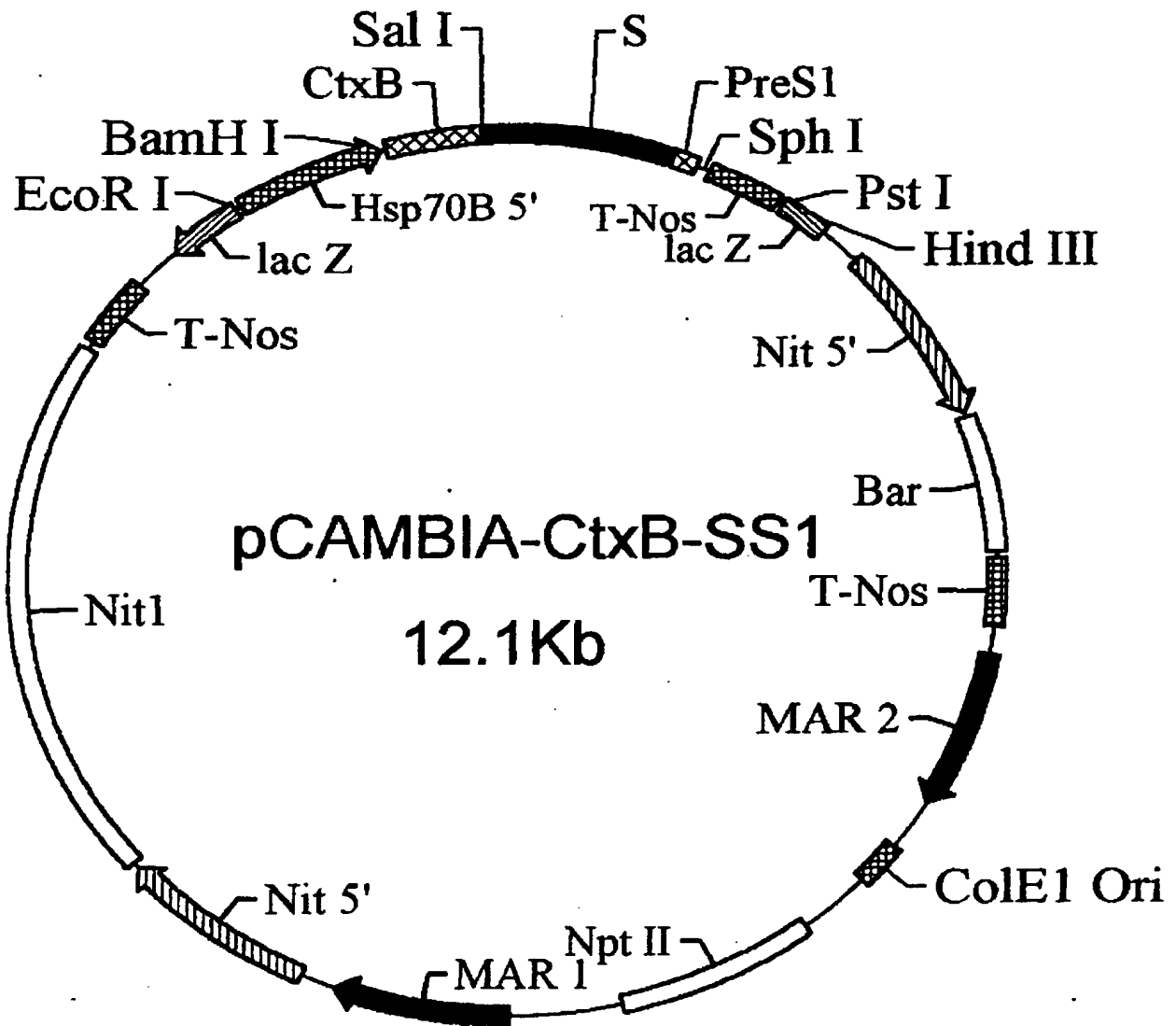


图 3